



In vivo imaging of ram spermatozoa in the ewe genital tract using fibered confocal microscopy

X. Druart, Juliette Cognie, G. Baril, F. Clement, J.-L. Dacheux, J.-L. Gatti

► To cite this version:

X. Druart, Juliette Cognie, G. Baril, F. Clement, J.-L. Dacheux, et al.. In vivo imaging of ram spermatozoa in the ewe genital tract using fibered confocal microscopy. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, 2011, 39 (11), pp.633-635. 10.1016/j.gyobfe.2011.09.007 . hal-00776193

HAL Id: hal-00776193


<https://hal.inria.fr/hal-00776193>

Submitted on 29 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

QUESTIONS À L'AUTEUR

	Revue : GYOBFE Numéro d'article : 2190	Merci de retourner vos réponses par e-mail ou par fax à : E-mail : corrections.esme@elsevier.thomsondigital.com Fax : +33 (0) 1 71 16 51 88
---	---	--

Cher auteur,

Vous trouverez ci-dessous les éventuelles questions et/ou remarques qui se sont présentées pendant la préparation de votre article. Elles sont également signalées dans l'épreuve par une lettre « Q » suivie d'un numéro. Merci de vérifier soigneusement vos épreuves et de nous retourner vos corrections soit en annotant le PDF ci-joint, soit en les listant séparément.

Pour toute correction ou modification dans les figures, merci de consulter la page <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Articles de numéros spéciaux : merci d'ajouter (dans la liste et dans le corps du texte) la mention « dans ce numéro » pour toute référence à d'autres articles publiés dans ce numéro spécial.

Références non appelées : Références présentes dans la liste des références mais pas dans le corps de l'article – merci d'appeler chaque référence dans le texte ou de les supprimer de la liste.	
Références manquantes : Les références ci-dessous se trouvaient dans le texte mais ne sont pas présentes dans la liste des références. Merci de compléter la liste ou de les supprimer du texte.	
Emplacement dans l'article	Question / Remarque Merci d'insérer votre réponse ou votre correction à la ligne correspondante dans l'épreuve
Q1 Q2	Merci de vérifier que les prénoms et les noms ont été correctement identifiés. Veuillez compléter l'adresse de correspondance en nous transmettant les éléments manquants, soit: [le numéro et le nom de la voie, la ville]

Utilisation des fichiers électroniques

Si nous n'avons pas pu exploiter le fichier de votre article et/ou de vos figures, nous avons utilisé la méthode suivante :

☐ Scan de (ou de parties de) votre article
 ☐ Ressaisie de (ou de parties de) votre article
 ☐ Scan des figures

Merci de votre collaboration.



Disponible en ligne sur
 ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
 EM|consulte
www.em-consulte.com



Quarante-deuxième Journée thématique de la Société française d'étude de la fertilité (Paris, 17 mars 2011)

Visualisation in vivo des spermatozoïdes de bélier dans le tractus génital de brebis par microscopie confocale fibrée

In vivo imaging of ram spermatozoa in the ewe genital tract using fibered confocal microscopy

X. Druart^{a,*}, J. Cognie^a, G. Baril^a, F. Clement^b, J.-L. Dacheux^a, J.-L. Gatti^a

^a UMR 6175 Inra, CNRS-université de Tours-Haras Nationaux, physiologie de la reproduction et des comportements, 37380 Nouzilly, France

^b INRIA Paris-Rocquencourt, Domaine de Voluceau, Rocquencourt BP 105, 78153 Le Chesnay cedex, France

INFO ARTICLE

Historique de l'article :

Reçu le 27 juillet 2011

Accepté le 19 août 2011

Disponible sur Internet le xxx

Mots clés :

Spermatozoïde

Imagerie in vivo

Tractus génital femelle

Transit

Fertilité

Keywords:

Sperm

In vivo imaging

Female genital tract

Transit

Fertility

RÉSUMÉ

Chez les mammifères domestiques, le transit des spermatozoïdes dans le tractus femelle, ainsi que leur survie durant la période pré-ovulatoire sont reconnus comme des éléments importants pour la réussite de l'insémination. Cependant, l'étude de ce transit est limitée par l'absence de méthode d'imagerie des spermatozoïdes in vivo. La visualisation des spermatozoïdes de bélier dans le tractus femelle de brebis a été possible grâce au couplage de la microscopie confocale fibrée et de l'utilisation de marqueurs fluorescents adaptés à l'observation in vivo, c'est-à-dire stables in vivo et marquant l'intégralité de la surface du spermatozoïde. Nos résultats montrent le rôle prédominant de la jonction utérutubaire, qui relie l'utérus à l'oviducte, dans la sélection des spermatozoïdes au cours du transit.

© 2011 Publié par Elsevier Masson SAS.

ABSTRACT

Sperm transit in the female tract is one of the key factors in the success of fertilization after artificial insemination in sheep species. However, its study is limited by the absence of in vivo imaging methods. The imaging of ram sperm in the female genital tract was made possible using the confocal fibered microscopy and fluorescent stains adapted to spermatozoa. Our results show the active role of the uterotubal junction in the selection of sperm during their transit.

© 2011 Published by Elsevier Masson SAS.

1. Introduction

Chez les mammifères domestiques, la réussite de la fécondation après accouplement ou insémination artificielle (IA) dépend de nombreux facteurs. Parmi ceux-ci, le transit des spermatozoïdes dans le tractus femelle, ainsi que leur survie durant la période pré-ovulatoire, sont reconnus comme des éléments importants. Cela est particulièrement vrai lorsque la semence est soumise à des processus de conservation, comme la congélation ou la conservation liquide pour des durées de un à plusieurs jours. Par exemple, chez les ovins, la fertilité de la semence congelée est équivalente à la fertilité après saillie naturelle lorsque la semence est déposée directement dans l'utérus, mais fortement réduite après un dépôt dans le vagin, en amont du col de l'utérus [1]. Cela suggère que le

passage du col de l'utérus par les spermatozoïdes est altéré par le procédé de conservation. Afin d'étudier l'impact de la conservation sur l'aptitude des spermatozoïdes à franchir le col de l'utérus et transiter dans le tractus femelle, la mise au point d'une méthode de quantification des spermatozoïdes in vivo était nécessaire. En effet, jusqu'à présent, les études quantitatives ont été réalisées ex vivo par histologie, microscopie électronique ou comptage des spermatozoïdes après lavage du tractus femelle obtenu après abattage des animaux [2]. Chez certaines espèces comme la souris et le hamster, les spermatozoïdes peuvent être directement observés ex vivo dans l'oviducte par transparence [3]. Les rares études réalisées in vivo chez les animaux domestiques sont basées sur la scintigraphie du tractus femelle après insémination avec des spermatozoïdes marqués avec un traceur radioactif, et permettent de visualiser les régions du tractus contenant des spermatozoïdes [4].

L'objectif de cette étude est donc de concevoir une méthode de visualisation in vivo des spermatozoïdes individuels dans le tractus

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : xavier.druart@tours.inra.fr (X. Druart).

génital femelle basée sur l'utilisation de la microscopie confocale
fibrée.

2. Patients et méthodes

La semence de trois béliers de race Lacaune est collectée à l'aide d'un vagin artificiel et diluée à une concentration finale de 1×10^6 spermatozoïdes par mL, dans un milieu à base de lait écrémé reconstitué (11,1 g de poudre de lait pour 100 mL d'eau déminéralisée) et supplémenté en antibiotiques (gentamycine à 50 μ g/mL). Quinze minutes avant l'IA, la semence est incubée à 37 °C avec un fluorochrome, l'octadécyl rhodamine B (R18) qui colore la membrane plasmique de tous les spermatozoïdes en orange. L'œstrus est induit chez 12 brebis de race Île de France par un traitement progestatif de 13 jours (éponges vaginales de 30 mg d'acétate de fluorogestone) suivi d'une injection de 500 unités de Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG) au moment du retrait de l'éponge. L'insémination, avec la semence diluée et colorée, est réalisée par voie intra-utérine, 55 heures après le retrait de l'éponge. Une quantité de 75×10^6 spermatozoïdes est déposée dans la base de chaque corne utérine, soit au total 150×10^6 spermatozoïdes par brebis. La visualisation des spermatozoïdes in vivo est réalisée à l'aide d'un microscope confocal fibré, le Cellvizio® (Mauna Kea Technologies, Paris). Ce système comprend une source d'excitation laser (488 nm), une fibre optique et un logiciel d'acquisition et de traitement des images vidéo, en temps réel. Parmi la gamme de fibres optiques disponibles et présentant des diamètres et des résolutions optiques différentes, une fibre de 1,5 mm a été retenue car son diamètre est compatible avec les dimensions de la lumière de l'utérus et de l'oviducte, et sa résolution latérale de 3,3 μ m permet de visualiser correctement les spermatozoïdes. Les images sont acquises à une fréquence fixe de 12 images par seconde. Une autre fibre de 4 mm, présentant une résolution supérieure (1,8 μ m), a également été ponctuellement utilisée pour observer les spermatozoïdes individuellement et visualiser les domaines

morphologiques (tête, pièce intermédiaire, flagelle). La quantification du transport des spermatozoïdes dans les voies génitales femelles est réalisée cinq heures après insémination. Les brebis sont placées sous anesthésie générale et le tractus génital (cornes utérines, oviductes et ovaires) est extériorisé par laparotomie. Afin d'insérer la fibre optique dans la lumière de l'utérus et de l'oviducte, un trou de 2 mm est réalisé à l'aide d'un bistouri électrique à différents niveaux : dans le corps utérin près du cervix, dans les régions basses et hautes de la corne utérine et, au niveau de la jonction utéro-tubaire. À partir de ces points d'entrée, l'acquisition des images est réalisée aux niveaux suivants : bas, milieu et haut de corne, jonction utéro-tubaire et oviducte. La procédure d'acquisition est standardisée et des séquences vidéo de deux minutes sont enregistrées à chaque niveau du tractus. À partir de chaque séquence, dix champs sont retenus aléatoirement et le nombre de spermatozoïdes par champ est compté. Un nombre moyen de spermatozoïdes par champ est ensuite calculé pour chacune des régions analysées. La distribution des spermatozoïdes au sein des différentes régions du tractus femelle est évaluée par analyse de variance (procédure GLM du logiciel SAS).

3. Résultats

Par laparotomie sous anesthésie générale, nous pouvons extérioriser le tractus femelle et accéder aisément aux différentes régions des cornes utérines (bas, milieu, haut), à la jonction utéro-tubaire entre l'utérus et l'oviducte (JUT), et à l'oviducte (Fig. 1A). Le site de dépôt de la semence, réalisé cinq heures auparavant par injection intra-utérine, peut être retrouvé au niveau du bas de la corne utérine. Une fibre optique est ensuite insérée dans la corne utérine et permet de visualiser la lumière et la paroi interne du tractus. La paroi de l'endomètre utérin présente une autofluorescence importante, tandis que la lumière apparaît sombre. Cette autofluorescence peut être utilisée pour visualiser la paroi de l'endomètre à l'échelle cellulaire (Fig. 1B). Les spermatozoïdes sont

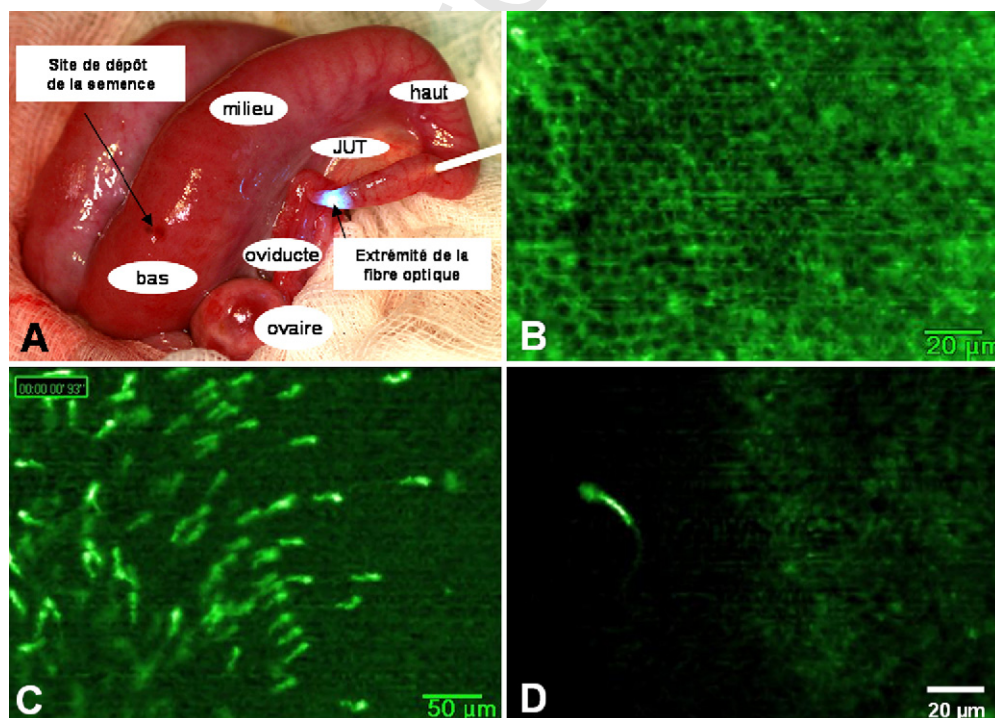


Fig. 1. Visualisation des spermatozoïdes dans le tractus génital femelle. A. Les cornes utérines de la brebis sont externalisées sous anesthésie générale quatre heures après insémination et la fibre optique du système de microscopie confocale fibrée est insérée dans la lumière de l'organe. B. Autofluorescence de l'épithélium de l'endomètre. C. Une population de spermatozoïdes en mouvement est visualisée à l'aide de la fibre optique de résolution latérale égale à 3,3 μ m. D. Les différents domaines morphologiques (tête, pièce intermédiaire, flagelle) d'un spermatozoïde mobile peuvent être visualisés in vivo à l'aide de la fibre optique de résolution latérale égale à 1,8 μ m.

retrouvés à différents niveaux du tractus en concentration croissante entre le bas de la corne et la jonction utérutubaire ($9,4 \pm 1,8$, $16,2 \pm 2,2$, $21,2 \pm 3,0$ et $21,9 \pm 2,9$ spermatozoïdes/champ pour, respectivement, le bas, le milieu, le haut de corne et la jonction utérutubaire), puis à une concentration beaucoup plus faible dans l'oviducte ($3,4 \pm 0,8$ spermatozoïdes/champ, $p < 0,05$). La microscopie confocale fibrée permet d'acquérir des séquences vidéo, donc d'observer la dynamique du transit des spermatozoïdes. Celui-ci est la résultante de la mobilité individuelle des spermatozoïdes et des contractions utérines ascendantes. Nous pouvons observer à la fois le mouvement d'ensemble dû aux contractions utérines (Fig. 1C), ainsi que la mobilité individuelle des spermatozoïdes (Fig. 1D).

4. Discussion

La visualisation des spermatozoïdes dans le tractus femelle a été possible grâce au couplage de la microscopie confocale fibrée et de l'utilisation de marqueurs fluorescents adaptés à l'observation in vivo. Nous avons expérimenté des marqueurs fluorescents couramment utilisés pour l'analyse des fonctions biologiques des spermatozoïdes, mais beaucoup se sont révélés inutilisables pour la visualisation in vivo, principalement à cause de leur intensité de fluorescence insuffisante ou de leur instabilité in vivo. Le marqueur R18 est un acide gras à longue chaîne (C18) couplé à une molécule de rhodamine. Le R18 permet de colorer les spermatozoïdes sur l'ensemble de leur surface en émettant une fluorescence dont l'intensité est stable pendant plusieurs heures in vitro et in vivo. Des essais préliminaires in vitro n'ont pas montré d'effet du R18 sur la viabilité et la mobilité des spermatozoïdes de bœuf. La nécessité d'un signal fluorescent d'intensité élevée est également liée à l'auto-fluorescence de l'épithélium utérin [5]. Il est à noter que l'oviducte, contrairement à l'utérus, ne présente pas d'auto-fluorescence. La microscopie confocale fibrée permet donc de visualiser les spermatozoïdes fluorescents avec une résolution suffisante, pour effectuer leur dénombrement et quantifier leur transit dans le tractus femelle. La stabilité du marquage in vivo nous a permis de retrouver

les spermatozoïdes jusqu'à 24 heures au moins après l'insémination. Nos résultats montrent un gradient croissant de la concentration en spermatozoïdes, entre le bas de la corne utérine et la jonction utérutubaire, quatre heures après l'insémination. Ce gradient peut s'expliquer par le rôle de barrière sélective que joue la jonction utérutubaire, en limitant fortement le passage des spermatozoïdes vers l'oviducte [6]. Le transit des spermatozoïdes est le résultat des contractions utérines et de la mobilité des spermatozoïdes. Il est donc important de pouvoir mesurer la mobilité des spermatozoïdes in vivo. La fréquence d'acquisition des images (12 images/s) permet de visualiser la mobilité et de caractériser les trajectoires des spermatozoïdes, selon des paramètres objectifs comme la vitesse linéaire. Toutefois, des développements seront nécessaires pour adapter les méthodes actuelles de mesure de la mobilité à ces nouvelles images vidéo obtenues in vivo. À l'avenir, nous étendrons l'utilisation de la microscopie confocale fibrée pour étudier le transit des spermatozoïdes in vivo dans d'autres espèces modèles.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci* 2000;62: 77–111.
- [2] Hunter RH. The Fallopian tubes in domestic mammals: how vital is their physiological activity? *Reprod Nutr Dev* 2005;45:281–90.
- [3] Suarez SS. Sperm transport and motility in the mouse oviduct: observations in situ. *Biol Reprod* 1987;36:203–10.
- [4] Bruckner G, Kampfer I, Rummer HJ, Menger H, Schneider G. Use of 131I labeling for studying the distribution and migration of spermatozoa in the genital tract of female sheep following artificial insemination. 1. Gamma camera studies of the course of migration. *Arch Exp Veterinarmed* 1982;36:297–305.
- [5] Drezek RA, Rebecca Richards-Kortum MAB, Feld MS, Pitris C, Ferenczy A, Faupel ML, et al. Optical imaging of the cervix. *Cancer* 2003;98:2015–27.
- [6] Suarez SS. Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *Int J Dev Biol* 2008;52(5–6):455–62.